

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CAMPUS PROFESSOR ANTÔNIO GARCIA FILHO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

MICHELE VITÓRIA DE MELO MONTEIRO

**AVALIAR A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) E
ANDIROBA (*Carapa guianensis aubl*) EM CEPAS CLÍNICAS
DE *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MICHELE VITÓRIA DE MELO MONTEIRO

**AVALIAR A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS
CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) E ANDIROBA (*Carapa guianensis*
Aubl) EM CEPAS CLÍNICAS DE *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Sergipe, Campus
Professor Antônio Garcia Filho, como exigência
para a obtenção do Diploma de Graduação em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. José Melquiades de Rezende
Neto

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Moreira de Lima

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CAMPUS DE LAGARTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

M775a Monteiro, Michele Vitória de Melo
Avaliar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais Citronela (*Cymbopogon winterianus*) e Andiroba (*Carapa guianensis Aubl*) em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*/
Michele Vitória de Melo Monteiro; orientador José Melquiades de Rezende Neto. – Lagarto/SE, 2017.
46 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) –
Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Plantas medicinais. 2. Óleos essenciais. 3. Ação antimicrobiana. 4. Microrganismo. I. Rezende Neto, José Melquiades de. orient. II. Título.

CDU 633.88:615.33

MICHELE VITÓRIA DE MELO MONTEIRO

**AVALIAR A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) E
ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl) EM CEPAS CLÍNICAS
DE *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Sergipe, Campus
Professor Antônio Garcia Filho, como exigência
para a obtenção do Diploma de Graduação em
Farmácia.

Orientador:
Prof. Dr. José Melquiades Rezende Neto
Co-orientador:
Prof. Dr. Claudio Moreira de Lima

Aprovado em: ____/____/____



Prof. Dr. Rafael Giro Marques



Prof. Dr. Rangel Rodrigues Bonfim

RESUMO

AVALIAR A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS CITRONELA (*Cymbopogon winterianus*) E ANDIROBA (*Carapa guianensis Aubl*) EM CEPAS CLÍNICAS DE *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Michele Vitória de Melo Monteiro, Lagarto, 2017.

Introdução: O estudo em questão teve como propósito identificar através de um experimento prático a ação antimicrobiana dos óleos essenciais Andiroba e Citronela em contato direto com microrganismos, sendo eles: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No desenvolvimento do estudo foram analisados os potenciais antimicrobianos dos óleos de maneira isolada, bem como sua ação quando combinados entre si em proporções distintas. **Objetivos:** Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela (extraído das folhas e caules de *Cymbopogon winterianus* Jowitt) e andiroba (extraído das sementes de *Carapa guianensis* Aubl) em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Métodos:** Foi realizado um experimento através da metodologia de diluição seriada, onde avaliou-se a atividade antimicrobiana dos óleos de andiroba e citronela puros e misturados em diferentes proporções (1:1, 1:2 e 2:1), frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Os dados foram tratados no software estatístico Graph Pad Prism, versão 5.0, através dos testes de *Dunnett* e *Tukey*, e analisados através de gráficos e quadros. **Resultados:** Os resultados encontrados indicaram que o óleo de andiroba puro não apresentou atividade antimicrobiana nas bactérias *S. aureus* e *E. coli* enquanto o óleo de citronela puro conseguiu apresentar atividade antimicrobiana na bactéria *E. coli*. Nas misturas entre os óleos testadas, a proporção 1:1 apresentou atividade antimicrobiana frente às duas bactérias, a proporção 1:2 não apresentou atividade antimicrobiana em nenhuma das bactérias testadas, enquanto a proporção 2:1 apresentou atividade antimicrobiana apenas frente à bactéria *E. coli*.

Palavras-chave: Óleos essenciais; Ação antimicrobiana; Microrganismo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Citronela-de-Java	11
Figura 2 – Árvore de Andiroba, em detalhes ramos e sementes	12
Figura 3 – Óleos Essenciais de Andiroba e Citronela	20
Figura 4 – Preparação dos Óleos Essenciais.....	21
Figura 5 - Placa de Elisa para o Experimento	23
Figura 6 – Resultado da placa após 24 horas	24
Figura 7 – <i>S. Aureus</i> em Óleo de Andiroba Puro	26
Figura 8 – <i>E. Coli</i> em Óleo de Andiroba Puro.....	27
Figura 9 – <i>S. Aureus</i> em Óleo de Citronela Puro	28
Figura 10 – <i>E. Coli</i> em Óleo de Citronela Puro.....	29
Figura 11 – <i>E. Coli</i> em Óleo de Citronela Puro (ampliado).....	30
Figura 12 – <i>S. Aureus</i> em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:1	32
Figura 13 – <i>E. Coli</i> em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:1	33
Figura 14 – <i>S. Aureus</i> em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:2	35
Figura 15 – <i>E. Coli</i> em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:2	36
Figura 16 – <i>S. Aureus</i> em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 2:1	37
Figura 17 – <i>E. Coli</i> em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 2:1	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Mistura dos Óleos Essenciais.....	22
Quadro 2 – Concentração Final do Óleo Essencial de Citronela (µL/ml)	23
Quadro 3 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>S. aureus</i> em Andiroba ($p < 0,05$)	25
Quadro 4 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>E. coli</i> em Andiroba ($p < 0,05$).....	26
Quadro 5 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>S. aureus</i> em Citronela ($p < 0,05$)	27
Quadro 6 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>E. coli</i> em Citronela ($p < 0,05$).....	28
Quadro 7 – Teste de <i>Tukey</i> para <i>E. coli</i> em Citronela ($p < 0,05$).....	29
Quadro 8 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>E. coli</i> em Citronela ampliado ($p < 0,05$)	30
Quadro 9 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>S. aureus</i> em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$)...	31
Quadro 10 – Teste de <i>Tukey</i> para <i>S. aureus</i> em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$)	32
Quadro 11 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>E. coli</i> em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$)	33
Quadro 12 – Teste de <i>Tukey</i> para <i>E. coli</i> em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$).....	34
Quadro 13 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>S. aureus</i> em Mistura CIT-AND 1:2 ($p < 0,05$).	34
Quadro 14 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>E. coli</i> em Mistura CIT-AND 1:2 ($p < 0,05$)	35
Quadro 15 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>S. aureus</i> em Mistura CIT-AND 2:1 ($p < 0,05$).	36
Quadro 16 – Teste de <i>Dunnett</i> para <i>E. coli</i> em Mistura CIT-AND 2:1 ($p < 0,05$)	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1 Óleos Essenciais.....	8
2.1.1 Óleo de Citronela.....	10
2.1.2 Óleo de Andiroba.....	12
2.2 Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais	13
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4 <i>Escherichia coli</i>	17
3 OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	20
4.1 Local de Execução do Estudo	20
4.2 Microorganismo	20
4.3 Obtenção dos Óleos Essenciais.....	20
4.4 Preparação dos Óleos Essenciais.....	21
4.5 Preparo dos Inóculos.....	21
4.6 Ensaio Antimicrobiano.....	22
4.7 Análise Estatística dos Dados	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Testes dos Óleos Essenciais Puros	25
5.2 Testes das Misturas de Óleos Essenciais	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais podem ser extraídos de parte de plantas como frutas, flores, cascas, ou de plantas inteiras, como especiarias e ervas medicinais. São caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis, capazes de gerar sabores e/ou aromas.

Parte das propriedades farmacêuticas descritas para plantas medicinais são creditadas aos óleos essenciais (OE). Fisicamente, se apresentam no estado líquido à temperatura ambiente, com aspecto incolor ou claro. Não se misturam à água, e podem ser extraídos de diferentes modos, como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras. O óleo obtido de uma planta serve como característica para aquela espécie (PROBST, 2012).

Os OE (óleos essenciais) são constituídos, geralmente, por hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até elementos como enxofre. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleo essencial, sua composição pode variar segundo a localização na planta (desde as flores, até botões, folhas, ramos, casca, semente, frutas, lenho, raízes e rizomas). As propriedades terapêuticas e organolépticas dos óleos essenciais, em geral, se devem à presença de monoterpenos, sesquiterpenos e de fenilpropanoides entre outros compostos voláteis relacionados a propriedades farmacológicas devido à volatilidade e a outras propriedades biológicas (SARTO & ZANUSSO JÚNIOR, 2014).

Ainda segundo Sarto e Zanusso Júnior (2014) os óleos essenciais têm sido largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, por sua ação antibacteriana, atividades antifúngica e inseticida. Atualmente, aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentos, produtos sanitários e indústrias de cosméticos.

Essas propriedades antimicrobianas têm sido reconhecidas baseadas na experiência prática durante séculos, mas recente foram confirmadas cientificamente. Por outro lado, os microrganismos que causam prejuízo a saúde humana estão se mostrando mais resistentes a maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (DUARTE, 2006).

O uso de óleos essenciais para o controle de microrganismo vem sendo

aplicado devido principalmente à busca por substâncias alternativas para o controle de microrganismos resistentes a antibiótico (ACOSTA *et al.*, 2003). No entanto, a disseminação de patógeno resistente aos antibióticos é uma das mais sérias ameaças ao tratamento bem-sucedido de doenças microbianas (STEWART & COSTERTON *apud* GEROMINI *et al.*, 2012).

Os compostos e suas porcentagens presentes nos OE variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas, os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2011).

Apesar de várias estruturas químicas isoladas de produtos do metabolismo secundário das plantas exercerem alguma ação antibacteriana, a maior parte destas moléculas apresenta atividade fraca e espectro de ação limitado quando utilizadas sozinhas. Porém, ao serem combinadas entre si ou com antibióticos, podem atuar como adjuvantes, modificando a resistência bacteriana frente determinadas drogas, diminuindo a dose necessária de antibióticos para um resultado eficaz (SIMÕES *et al.*, 2004).

O problema da resistência microbiana está aumentando e a perspectivas dos estudos de agentes para combater esses microrganismos também, atualmente com a emergência de linhagem de bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, observa-se uma renovação no interesse pela busca de agentes antimicrobianos alternativos. Além disso, o consumidor tem valorizado cada vez mais a disponibilização de produtos cosméticos e alimentícios mais naturais, saudáveis e que possam trazer alguns benefícios à saúde. Esses fatores têm contribuído para aumentar o interesse na pesquisa de produtos naturais que apresentam atividades biológicas tais como atividade antimicrobiana. Então a possibilidade de ampliar esse arsenal terapêutico justifica avaliar a atividade isolada e combinada de óleos essenciais, por apresentarem atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias e serem de origem natural, os óleos essenciais apresentam grande potencial nessa utilização para esse estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Óleos Essenciais

Acredita-se que os primeiros usos dos óleos essenciais tenham sido através de bálsamos, ervas aromáticas e resinas que eram usadas para embalsamar cadáveres em cerimônias religiosas há milhares de anos atrás. Existem relatos do uso de essenciais pelos chineses, em 2700 a.C, no mais antigo livro de ervas do mundo, *Shen Nung* que cita plantas como gengibre e ópio. Outro uso documentado de óleos essenciais se deu em 2000 a.C. em livros escritos em sânscrito, pelos hindus. Nessa época, já havia um conhecimento mais rudimentar de aparatos de destilação e há relatos de outros povos que fizeram uso desses compostos, como persas e egípcios. Muitas das ervas comuns na atualidade já eram conhecidas, como, por exemplo, o capim limão que era empregado em cerimônias religiosas ou fins terapêuticos (TRANCOSO, 2013).

Durante as Cruzadas, o conhecimento se difundiu entre os árabes, que em pouco tempo aperfeiçoaram técnicas e aparatos de destilação. O que conferiu ao físico árabe Avicena o mérito de ser o primeiro a extrair óleo de rosas. Os árabes foram mestres na alquimia e, não por acaso, são conhecidos naquele momento da história como bem aperfeiçoados na medicina e terapias naturais (TRANCOSO, 2013).

As plantas com propriedades terapêuticas utilizadas no cuidado da saúde tradicional constituem uma importante fonte de novos compostos biologicamente ativos (SARTO & ZANUSSO JÚNIOR, 2014). O uso de plantas e derivados pelo homem objetivando a promoção e manutenção de sua saúde pode ser comprovado historicamente por registros de longa data, como por exemplo, os egípcios, assírios, mesopotâmicos, indianos, chineses e outras civilizações que sempre contavam com a figura de curandeiro ou equivalente. Era quem indicava a espécie de planta correta para afecções variadas, desde febres, distúrbios psicológicos e gastrointestinais, a infecções bacterianas, acne, gota, e até epilepsia, pelo emprego de formulações simples, como cataplasmas, chás, decoctos, pós, defumadouros, tinturas e outras formulações herbais (BALUNAS & KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005).

Segundo Figueiredo (*apud* PROBEST, 2012) os óleos essenciais são utilizados há séculos como flavorizantes, na fabricação de cosmético e farmacologicamente com fins medicinais, o que tem estimulado a procura por substâncias biologicamente ativas e eficazes, especialmente com microrganismo. Outro aspecto é que pelo fato de

serem naturais e biodegradáveis geralmente apresentam baixa toxicidade aos mamíferos e por poderem atuar sobre várias moléculas-alvo ao mesmo tempo, quando comparado a fármaco sintético, tornam-se substâncias chaves para pesquisas de novos medicamentos.

O Brasil tem lugar de destaque na produção de OE, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatros grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos OE de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. No passado, o país teve destaque como exportador de OE de pau-rosa, sassafrás e menta. Nos dois últimos casos, passou à condição de importador (BIZZO *et al.*, 2009).

Muitos compostos naturais presentes nas plantas, e condimentos têm apresentado atividade biológica e servem como fonte de agentes antimicrobianos contra diversos patógenos. Entre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais, constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas. Assim, estes compostos vegetais possuidores de propriedades antimicrobianas, têm notadamente, recebido ênfase em um possível uso racional na conservação de alimentos (KIZIL & SOGUT, 2003).

O uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância por apresentarem componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deterioração, oxidação e o ataque de microrganismo, apresentando eficiência nas funções antioxidante e antimicrobianas (ACOSTA, 2003).

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas. Além disso, muitas plantas exóticas foram introduzidas no Brasil desde colonização e incorporadas na medicina popular (ALVES *et al.*, 2000).

O estudo realizado por Pedrosa (2012) mostra que uma característica importante dos componentes do óleo essencial é a hidrofobicidade que permite interagir com os lipídeos da membrana celular bacteriana, alterando a organização das estruturas celulares, tornando-as permeáveis. O extravasamento de moléculas e íons essenciais levará a morte celular dos microrganismos.

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produto de excreção do vegetal. Atualmente, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permite a adequação da planta a

seu meio, sendo reconhecidas várias funções de substância pertencentes a essa classe de metabólitos, como, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismo, proteção UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, bem como sua participação em alelopatias (CARDOSO, 2001).

Portanto, a biologia, a farmacologia, a tecnologia de alimentos e outras áreas tem se interessado em buscar informações úteis para a correta utilização desses compostos, que possuem distribuição química peculiares (PEREIRA, 2006).

2.1.1 Óleo de Citronela

Conhecida como capim-citronela, *Cymbopogon winterianus* (Figura 1), é uma planta perene, formadora de rizoma, pertencente à família *Poaceae*, sendo largamente cultivada em regiões tropicais do planeta em função de suas propriedades aromáticas. Existem basicamente dois tipos de citronela: *Cymbopogon nardus* var. *lenabatu* (L.) Rendle e *Cymbopogon winterianus* Jowitt. O cultivo de citronela no Brasil toma importante espaço no mercado de produtos naturais, devido à grande procura por seu óleo essencial tanto no mercado interno quanto para exportação (ROCHA *et al.*, 2000).

Figura 1 – Citronela-de-Java



Fonte: Mello (2014).

Seus componentes principais são citronelal, geraniol e citrônolol. O citrônolol é considerado um excelente repelente de insetos, além de apresentar ação antimicrobiana e antifúngica (TAWATSIN *et al.*, 2001). Segundo Rocha *et al.* (2000), esta espécie é de grande uso popular como repelente de insetos, sendo seu óleo largamente usado nas regiões litorâneas do Brasil e também por população ribeirinha no interior do país. Seu uso é recomendado em combinação a óleos minerais ou vegetais para evitar as picadas de inseto, sendo sua eficácia bastante discutida.

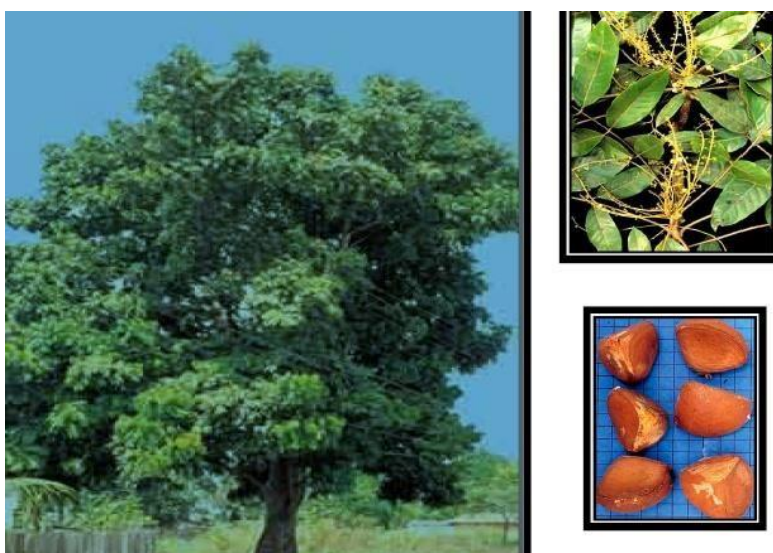
O gênero *Cymbopogon* inclui cerca de 140 espécies e é amplamente distribuído nas regiões de climas semitemperado a tropical em todo o mundo. Duas espécies principais de citronela são conhecidas e têm importância industrial na área farmacêutica, cosmética e de perfumaria: *C. nardus* (citronela do Ceilão) e *C. winterianus* (citronela de Java). Dentre suas atividades biológicas, destacam-se a ação repelente de insetos, apresentando atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti* e a atividade antimicrobiana (SILVEIRA, 2012).

O óleo extraído das suas partes aéreas é utilizado nas indústrias farmacêuticas, na produção de cosmético. Apresenta como principais propriedades qualitativas o frescor, a intensidade cítrica e o aroma levemente frutal ao óleo do capim-limão (GALVÃO, 2014). Seu óleo essencial é composto por monoterpenos e sesquiterpenos. A principal forma de obtenção do óleo essencial é por hidrodestilação e o rendimento com base na matéria-prima *in natura* é de aproximadamente 0,5 – 1,0% (BENETI *et al.*, 2011).

2.1.2 Óleo de Andiroba

O termo andiroba é derivado da língua indígena e seu significado óleo amargo (SILVA, 2005). A andiroba (*Carapas guianensis Aublet*) é uma árvore de grande porte (Figura 2), podendo atingir 30 metros de altura, pertencente à família *Meliaceae*, podem ser encontradas em toda a América tropical e no Brasil distribui-se pela região Amazônica, principalmente nas áreas alagadiças (LORENZI, 1992).

Figura 2 – Árvore de Andiroba, em detalhes ramos e sementes



Fonte: Lorenzi (1992).

A andiroba é de uso múltiplo: a madeira utilizada para fabricação de móveis, construção civil, lâminas e compensado e as sementes para extração de óleo. Ao longo da história do Amazonas o óleo de andiroba teve uma importante participação na economia regional e continua sendo muito apreciado, principalmente, na medicina popular. Em comparação com a exploração madeireira, a coleta das sementes necessita pouco investimento e, além de não ser destrutiva, a produção do óleo pode assegurar um retorno econômico anual para a população local (MENDONÇA & FERRAZ, 2007).

O óleo e seus subprodutos, tais como sabonetes e velas são geralmente encontrados em feiras livres. O óleo também tem sido comercializado para outras regiões do país, além de ser exportado, principalmente, para indústria de cosméticos

da França, Alemanha e dos Estados Unidos (GONÇALVES, 2001).

O processo tradicional de extração do óleo de andiroba pode ser realizada por dois tipos: método artesanal e método industrial, porém tais características variam muito de acordo com o processo de extração (CARVALHO, 2004). Entretanto, deve-se ressaltar que ainda há pessoas que realizam a extração tradicional, principalmente, em localidades isoladas, sem eletricidade, e com escassez de bens e serviços (MENDONÇA & FERRAZ, 2007).

A composição química do óleo extraído da semente da andiroba é representada por estearina, ácidos graxos, oleico e mirístico e em menor quantidade pelos ácidos palmíticos e linoleico (LORENZI, 2008). O óleo vegetal é um líquido amarelo, de sabor amargo, que é extraído de suas sementes por prensagem, mas solidifica em temperaturas abaixo de 25° C, tornando-se uma gordura esbranquiçada. É muito conhecido pela medicina popular e oficialmente reconhecido como possuidor de propriedade anti-inflamatória, analgésicas, antissépticas, cicatrizante e para o trato respiratório (GONÇALVES, 2001).

2.2 Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais

As propriedades antimicrobianas e a identificação de componentes ativos de vários óleos essenciais têm sido demonstradas. Devido as diversas propriedades antissépticas, os óleos essenciais eram utilizados antigamente como antimicrobiano, analgésicos, sedativos, anti-inflamatória e anestésicos. Tais características não mudaram muito nos últimos tempos, exceto pelo fato que, nos dias atuais, os efeitos antimicrobiano destes óleos se tornaram mais conhecidos, devido aos estudos de seu mecanismo de ação (COSTA *et al.*, 2005).

A atividade antibacteriana vai depender do tipo, composição e concentração da espécie ou do óleo essencial, a composição do substrato, o processamento e condições de estocagem e tipo do microrganismo em questão (BERTINI *et al.*, 2005). O mecanismo de ação dos óleos essenciais tem sido bastante discutido devido à quantidade e variedade dos compostos químicos presentes, o que dificulta a atribuição de um mecanismo de ação específico para a atividade antimicrobiana (BONA *et al.*, 2012).

A maioria dos óleos essenciais provavelmente exerce efeitos antimicrobianos, afetando a estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando

proteínas e podendo alterar a permeabilidade da membrana plasmática, causando a interrupção de processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações, resultando em perda de controle quimiosmótico, levando a morte celular (GEROMINI *et al.*, 2012).

Os locais, ou estrutura, da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os componentes de produtos naturais, são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força de próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação de conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios ser afetados em consequências de outros mecanismos (SILVA, 2010).

As características citotóxicas dos óleos essenciais tem sido objeto de estudo para compreensão dos efeitos frente às bactérias. A citotoxicidade dos óleos essenciais parecem estar relacionadas com a sua capacidade de provocar danos à parede celular, pois, como compostos lipofílicos típicos, passam através da parede e membrana citoplasmática, podendo afetar a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, permeabilizando-as. Onde essa permeabilização estará associada a perda de íons e a redução do potencial de membrana, ao colapso da bomba de prótons e esgotamento de ATP (LIMA *et al.*, 2006).

Devido ao aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas e a susceptibilidade de atuarem sobre numerosos tipos de substratos, com diferentes temperaturas, pH e condições do meio ambiente, surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas o que incentiva a procura por antibióticos naturais. Os óleos essenciais podem apresentar ação antimicrobiana por três formas: interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular da bactéria, pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares, e por alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos como os envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais ou destruição do material genético (SARTO & ZANUSSO, 2014).

Várias são as atividades farmacológicas conhecidas de alguns óleos essenciais, seja na medicina popular ou em pesquisas científicas. Dentre estas, cita-se: ação carminativa, antiespasmódica, estimulante sobre secreções do aparelho digestivo, cardiovascular, irritante tópica ou revulsiva, secretolítica, sobre o sistema nervoso central (SNC), analgésica local, anti-inflamatória, antisséptica (inibindo

crescimento de bactérias e fungos), inseticida, entre outras (SARTO & ZANUSSO, 2014).

A ação antimicrobiana das especiarias e de seus OE nos diferentes micro-organismos tem sido relatada em diversos estudos, principalmente devido ao aumento da resistência que os micro-organismos apresentam em relação aos antibióticos de uso comum utilizados nos tratamentos de diversas enfermidades. Os óleos essenciais e os componentes monoterpenos e muitos sesquiterpenos são considerados os agentes antimicrobianos mais importantes presentes em plantas, eles podem também apresentar atividade antioxidante e anti-inflamatória (COWAN, 1999).

Os óleos essenciais originam-se do metabolismo secundário das plantas, sendo constituídos por uma mistura de compostos, principalmente monoterpenos, sesquiterpenos, e derivados oxigenados (álcoois, aldeídos, éster, éteres, cetonas, fenóis e óxidos). Outros compostos voláteis incluem fenilpropanoides e substâncias contendo enxofre ou nitrogênio (BAJPAI *et al.*, 2008).

Os metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de plantas são alvos de maior interesse, pois agem como substâncias de defesa contra microrganismo patogênico, insetos e animais herbívoros, têm composição química variada, com presenças de terpenoide, alcaloide e cumarinas, que apresenta com frequência atividade antimicrobiana (PERINI, 2013).

Os óleos essenciais apresentam atividade contra uma ampla variedade de microrganismos: vírus, fungos, protozoários e bactérias. Os compostos e suas porcentagens presentes nos OE variam de acordo com a espécie considerada, as condições de coleta e extração, e as partes da planta utilizadas. Os principais compostos isolados dos óleos essenciais são terpenos e seus derivados oxigenados, terpenoides, incluindo os compostos fenólicos (SOLÓRZANO-SANTOS & MIRANDA-NOVALES, 2011).

Combinações entre OE podem alcançar o mesmo potencial descrito para óleos isolados, porém em concentrações menores, favorecendo o emprego como antimicrobianos de uso clínico e na conservação de alimentos, sendo que a ação conjunta dos diferentes compostos químicos pode fornecer alternativa para o controle de bactérias multirresistentes (GUTIERREZ *et al.*, 2008).

Como o objetivo dessa pesquisa é avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de andiroba e citronela em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, cabe caracterizar os microrganismos que fazem parte do objeto de

estudo.

2.3 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae* e apresentam-se como cocos gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, imóveis e agrupadas em massas irregulares ou em “cachos de uva”. São aeróbicas facultativas, produtoras de catalase e normalmente beta-hemolíticas. Fermentam a glicose com produção de ácido tanto em aerobiose como anaerobiose (TORTORA, 2002).

É causador de um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar do mundo, sendo necessárias 10^6 células desse microrganismo por gramas de alimento para que a toxina seja acumulada em níveis capazes de provocar toxinoses (RODRIGUES *et al.*, 2004). São bactérias mesófilas, com temperatura de crescimento variando entre 7 °C e 47,8 °C, com produção de enterotoxina entre 10 °C a 46 °C (FRANCO *et al.*, 1996).

Diante disso, é uma bactéria de grande interesse médico, pois está relacionada a diversas infecções em seres humanos. Pode provocar doenças desde infecções como espinhas, furúnculos ou celulites até infecções graves como pneumonia, endocardites, meningites, dentre outras. Pertencentes ao grupo dos cocos gram e catalase positivas, não possuem mobilidade, não esporulados e geralmente não encapsulados, normalmente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Podem apresentar-se em diferentes formas como isoladas, aos pares, em cadeias curtas ou agrupados irregularmente (PEDROSA, 2012).

Dentre as espécies, o *Staphylococcus aureus* é maior causador de toxinose alimentar em humanos, pois produz compostos extracelulares, com as enterotoxinas estafilocócicas, coagulase, nuclease e lipase. As enterotoxinas são responsáveis pela toxinose e, em particular, na área de vigilância sanitária de alimentos são maior causador de surtos de toxinfecção durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos (SANTOS, 2004).

Portanto os principais substratos alimentícios, capazes de suportar o desenvolvimento natural do *Staphylococcus aureus*, podem ser citados os produtos lácteos, como os queijos, leite cru ou pasteurizado, manteiga, sorvetes e produtos de confeitaria, como bolos, ovos e massa alimentícia. Mesmo sendo considerado parte

da microbiota natural do ser humano, em algumas condições o *S. aureus* pode tornar-se patogênico e causar uma ampla variedade de infecções, sendo o responsável por diversas infecções nosocomiais e comunitárias. Tais episódios são desencadeados pela ruptura da barreira cutânea ou queda da imunidade (SANTOS, 2004).

2.4 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram negativa, anaeróbica facultativa e um dos habitantes mais comuns do trato intestinal. Sua presença na água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal, porém não é normalmente considerada patogênica, entretanto, pode ser responsável de infecções urinárias e produtos enterotoxinas, que podem causar graves doenças de origem alimentar (TORTORA, 2002).

Pertence à família *Enterobacteriaceae*, pode ser móvel, dotada de flagelos peritríquios ou imóvel. É um gênero com grande número de linhagens e pode ser encarado como possuidor de uma única espécie na qual existem várias centenas de diferentes tipos antigênicos (PEREIRA, 2006).

A classificação sorológica desse micro-organismo compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de antissoros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, os antígenos O (polissacarídeo O), K (antígeno capsular) e H (antígeno flagelar). Nem todas as amostras de *E. coli*, provenientes do intestino humano como também de qualquer outro local do organismo, apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo (TRABULSI, 2002). Essa sorologia é importante para identificação de espécimes patogênicas, principalmente em surtos de infecções alimentares.

Esses sorotipos estão relacionados com virulência, mas isso depende da presença de plasmídeos com genes para produção de exotoxinas ou outros fatores de patogenicidade e seu período de incubação é de 12 a 72 horas e a duração da doença de 2 a 7 dias (TONDO *et al.*, 2011; FORSYTHE, 2013).

Os isolamentos clínicos de *E. coli* podem ser convenientemente agrupados em três categorias como: amostra oportunista, enteropatogênicas e enteroxigênicas. Os colibacilos patogênicos oportunista são, e geral, inócuos em seu habitat natural até que alcancem outros tecidos, podendo causar doenças como, enterites, meningites, infecções pulmonares, abscessos, infecções de pele e ferimentos (MAIA, 2003).

Possuem um papel nutricional importante, sintetizando vitaminas, especialmente a vitamina K. A *Escherichia coli* geralmente permanece confinada ao lúmen intestinal sem causar nenhum dano, entretanto, em organismo imunossuprimidos ou debilitados, ou quando a barreira gastrointestinal é violada, até mesmo as linhagens não patogênica de *E. coli* podem causar infecções (MAIA, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela (extraído das folhas e caules de *Cymbopogon winterianus* Jowitt) e andiroba (extraído das sementes de *Carapa guianensis* Aubl) em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de andiroba em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de citronela em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Avaliar os efeitos sobre a atividade antimicrobiana individual, da mistura dos óleos essenciais de citronela e andiroba nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 sobre as cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Local de Execução do Estudo

O projeto foi desenvolvido no laboratório de pesquisa da Universidade Federal de Sergipe campus Lagarto, onde foram avaliadas as atividades antimicrobianas de óleos essenciais de Citronela e Andiroba, em isolados de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* provenientes de cepas clínicas.

4.2 Microorganismos

Foram utilizadas no estudo cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* PNCQ e *Escherichia coli* PNCQ, pertencentes a coleção de microorganismos armazenada no laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Sergipe UFS, Lagarto, Sergipe, Brasil.

4.3 Obtenção dos Óleos Essenciais

O óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt tipo Java (citronela) é um óleo extraído das folhas e caules por arraste a vapor. O óleo essencial de *Carrapa guianensis* Aubli (andiroba) é um óleo extraído das sementes por prensagem a frio sem utilização de solventes ou substâncias químicas. Os óleos foram adquiridos da empresa Destilaria Bauru (www.destilariabauru.com.br).

Figura 3 – Óleos Essenciais de Andiroba e Citronela



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

4.4 Preparação dos Óleos Essenciais

Foram preparados os óleos de andiroba e citronela puros v/v com dimetilsulfóxido (DMSO) e nas proporções 1:1, 1:2 e 2:1, também misturados v/v com DMSO.

Figura 4 – Preparação dos Óleos Essenciais



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Quadro 1 – Proporção dos Óleos Essenciais

Ensaio	Citronela	Andiroba	Mistura	DMSO	Diluição
1	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	1/1
2	5 µL	10 µL	5 µL	5 µL	1/2
3	10 µL	5 µL	5 µL	5 µL	2/1

Fonte: Elaboração Própria.

4.5 Preparo dos Inóculos

Pegou-se 2mL de meio de cultura e 200µL do caldo da bactéria, foram utilizadas cepas padrões PNCQ 348 de *S. aureus* e PNCQ 339 *E. coli*. Em seguida, faz-se um inóculo em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para bactéria. Posteriormente, foram testados cada tipo de óleo, individualmente, bem como sua mistura para avaliação do efeito antimicrobiano sobre os respectivos microrganismos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.6 Ensaios Antimicrobianos

Os testes foram realizados em triplicata utilizando-se a técnica de micro diluição seriada em placa de microtitulação. Em cada coluna, exceto a primeira se colocou 190 µL de caldo BHI, e nas demais foram colocados 100 µL. Exatamente 10 µL de óleo essencial diluído v/v em DMSO foram colocados na primeira coluna, foram transferidos 100 µL da 1ª coluna para as demais colunas (diluição seriada base 2). Transferiu-se 100 µL da coluna 11 para o descarte, pois na coluna 12 estava o controle positivo, que seria o meio de cultura com o microorganismo testado. Em seguida colocou-se 10 µL de suspensão microbiana de *Staphylococcus aureus* em todos os poços das linhas A, B e C, e nos poços das linhas D, E e F 10 µL de uma suspensão de *Escherichia coli*, todas em meio de cultura BHI (ajustada a turbidez em 0,5 na escala de MacFarland correspondendo a 10⁸ UFC/ml, na linha G estava o controle de esterilidade do meio de cultura mais o óleo essencial, na linha H o controle de esterilidade do meio de cultura. A verificação da atividade antimicrobiana foi conduzida em placa de microtitulação. Para cada ensaio foi realizado um controle positivo, que foi o microorganismo com o meio de cultura sem o óleo. Após a realização do procedimento as microplacas as 5 placas de microtitulação foram incubadas a uma temperatura de 37°C, por um período de 24 horas e então foi realizada a leitura das placas em leitora de placas de microtitulação, em comprimento de onda de 600nm.

Quadro 2 – Concentração Final do Óleo Essencial de Citronela (µL/ml)

	Microorganismo	25	12,5	6,250	3,125	1,5625	0,781	CP*
A	<i>S. aureus</i>							
B	<i>S. aureus</i>							
C	<i>S. aureus</i>							
D	<i>E. coli</i>							
E	<i>E. coli</i>							
F	<i>E. coli</i>							
G	CEmc+ oe**							
H	CEmc***							

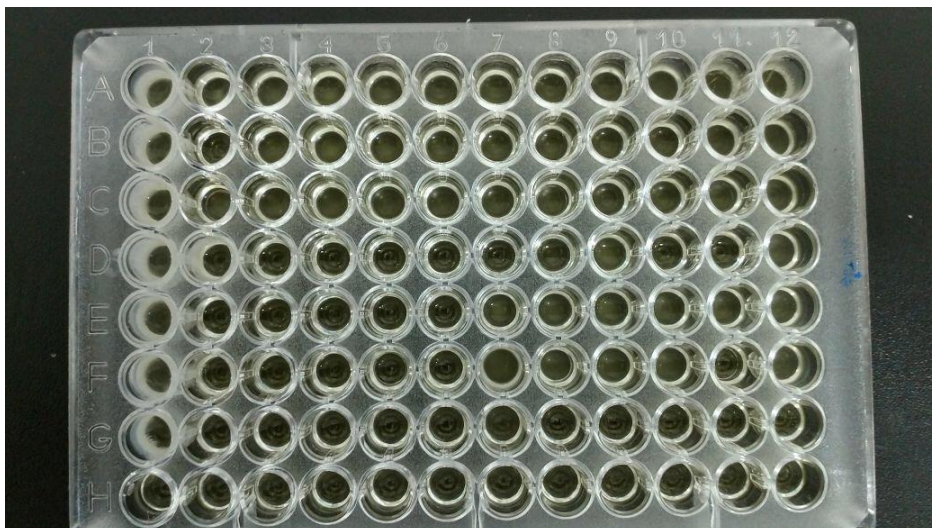
CP*: controle positivo dos microrganismos;

CEmc+oe**: controle de esterilidade do meio de cultura mais o óleo essencial;

CEmc***: controle de esterilidade do meio de cultura.

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

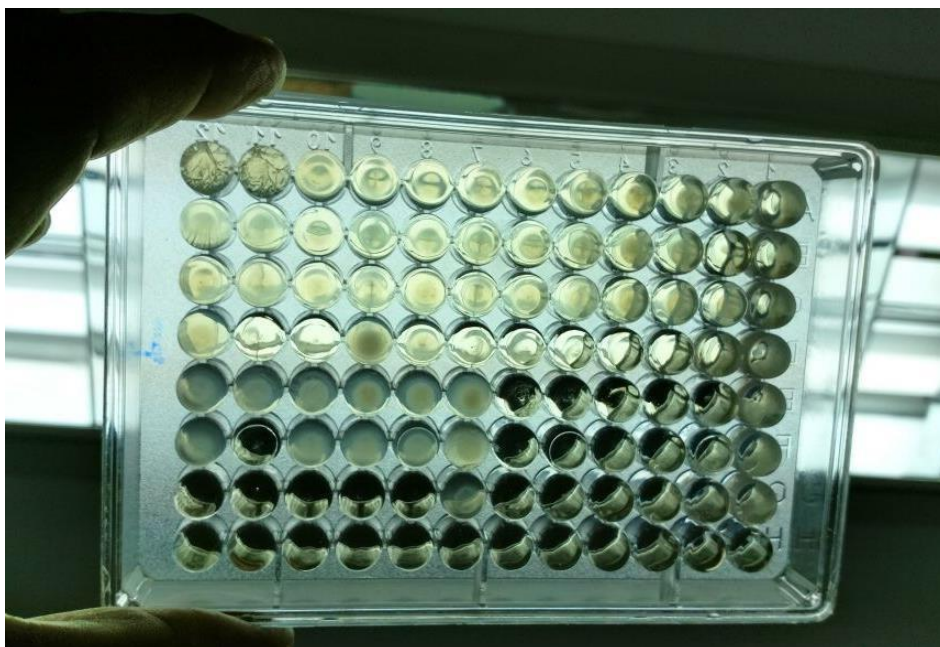
Figura 5 - Placa de Elisa para o Experimento



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Para todos os ensaios as microplacas foram tampadas, em seguida incubadas em estufa 37 °C, por 24 horas, após o que se realizou a leitura do teste (PERINI,2013). Após 24 horas de incubação, os resultados foram avaliados (Figura 6).

Figura 6 – Resultado da placa após 24 horas



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

4.7 Análise Estatística dos Dados

Para a análise comparativa entre os tratamentos, com o controle positivo utilizou-se o teste de *Dunnet* para comparar as médias do tratamento apenas com a média do controle e o teste de *Tukey* para comprar as médias que deram diferentes do controle duas a duas. Os testes foram realizados no software estatístico Graph Pad Prism, versão 5.0. A análise dos resultados foi feita através de gráficos e quadros elaborados pela autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados dos testes realizados com os óleos essenciais de andiroba e citronela frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Como referência para a comparação da atividade antimicrobiana dos óleos utilizou-se um controle positivo. Para comparação dos resultados utilizou-se o teste de *Dunnett* e nos casos onde houve diferença significativa foi feito o teste de *Tukey*. Foram realizados testes dos óleos puros e de misturas em diferentes proporções. A seguir, apresenta-se a análise dos resultados encontrados.

5.1 Testes dos Óleos Essenciais Puros

Para medir a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de andiroba e de citronela, obteve-se um controle positivo (CP), que foi utilizado como referência para comparação. Na obtenção do controle positivo utilizou-se um microrganismo em um meio de cultura, onde ele poderia crescer livremente. Em seguida, realizou-se o teste com diferentes concentrações do óleo de andiroba puro: 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, nas bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Para comparação entre as diferentes concentrações do óleo e o controle positivo, utilizou-se o teste de *Dunnett*, onde cada resultado foi comparado ao do controle positivo. Os resultados do teste indicaram que não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações do óleo de andiroba utilizadas na bactéria *S. aureus*, como mostra o Quadro 3, a seguir.

Quadro 3 – Teste de *Dunnett* para *S. aureus* em Andiroba ($p < 0,05$)

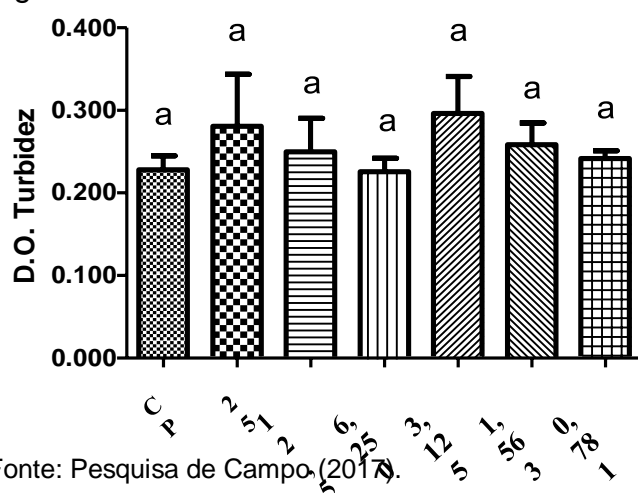
Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,05067	Não
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,02033	Não
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,004333	Não
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,06633	Não
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,02933	Não
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,01133	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Como demonstra a Figura 7, o comportamento da *S. aureus* frente ao óleo de andiroba puro é estatisticamente semelhante ao comportamento da mesma no

controle positivo. Pode-se observar que as colunas com as diferentes concentrações do óleo de andiroba puro apresentam todas a letra “a”, mesma letra que aparece no controle positivo. Isso significa que, apesar de as colunas do gráfico apresentarem tamanhos diferentes, o comportamento da bactéria é considerado estatisticamente semelhante ao comportamento que se obteve no controle positivo, ou seja, com o óleo de andiroba nas diferentes concentrações testadas não foi possível obter crescimento da bactéria menor que no controle positivo, conforme apresenta a Figura 7, a seguir.

Figura 7 – *S. Aureus* em Óleo de Andiroba Puro



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Em seguida, testou-se o óleo de andiroba puro em diferentes concentrações na bactéria *E. coli*: 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Conforme o teste de *Dunnnett* realizado (Quadro 4), não houve diferenças significativas estatisticamente em todas as concentrações testadas, o que significa que com o óleo de andiroba puro não se obteve crescimento da bactéria *E. coli* menor que no controle positivo.

Quadro 4 – Teste de *Dunnnett* para *E. coli* em Andiroba ($p < 0,05$)

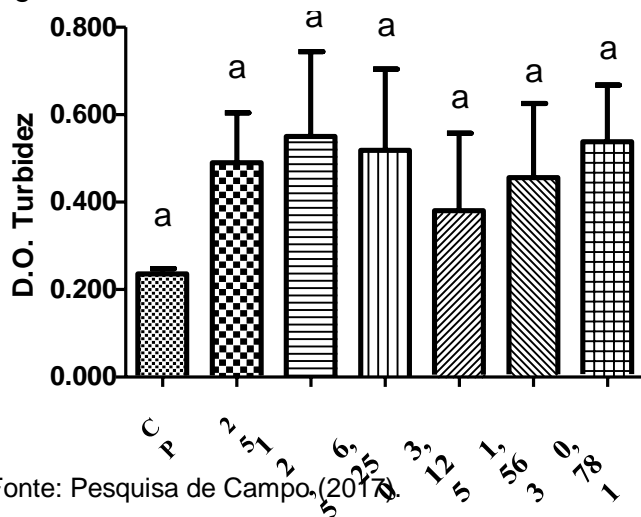
Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,2543	Não
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,3160	Não
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,2847	Não
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1420	Não
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,2170	Não
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,2987	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Como pode-se observar na Figura 8, as colunas com as diferentes concentrações do óleo apresentam a mesma letra que o controle positivo, a letra “a”. Desse modo, pode-se concluir que a bactéria se comportou de maneira semelhante

ao controle positivo nas diferentes concentrações de óleo de andiroba. Na Figura 8, a seguir, está representado o comportamento da bactéria *E. coli* frente ao óleo de andiroba puro nas diferentes concentrações testadas.

Figura 8 – *E. Coli* em Óleo de Andiroba Puro



Fonte: Pesquisa de Campo, (2017).

Nos testes realizados com óleo de citronela puro procedeu-se de maneira semelhante aos testes com o óleo de andiroba. Utilizou-se concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ do óleo de citronela puro. Quanto à bactéria *S. aureus*, o teste de *Dunnnett* realizado (Quadro 5) mostrou que não houve diferença significativa, o que implica que com o óleo de citronela puro não foi possível conseguir um crescimento menor da bactéria do que no controle positivo.

Quadro 5 – Teste de *Dunnnett* para *S. aureus* em Citronela ($p < 0,05$)

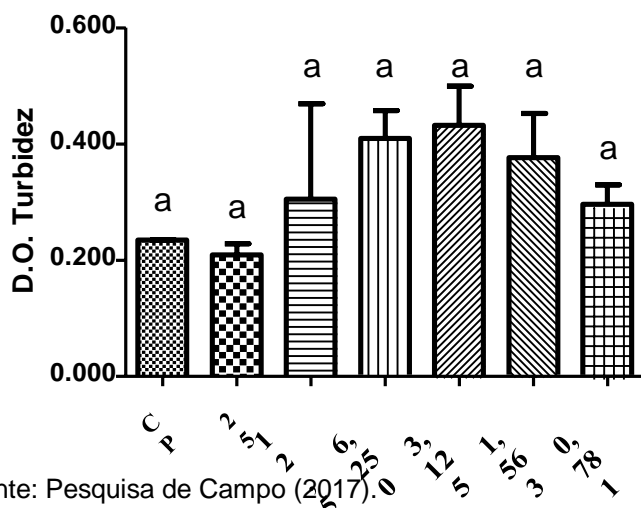
Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,02683	Não
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,07017	Não
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1712	Não
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1988	Não
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1385	Não
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,05817	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

A Figura 9 mostra o comportamento da bactéria *S. aureus* frente ao óleo de citronela puro nas diferentes concentrações testadas. Como pode-se observar, todas as concentrações testadas apresentam a letra “a”, igualmente ao controle positivo, o que significa que em todas as concentrações de óleo de citronela puro a bactéria

apresentou comportamento estatisticamente semelhante ao controle positivo, não sendo possível obter crescimento menor do que no controle positivo.

Figura 9 – *S. Aureus* em Óleo de Citronela Puro



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

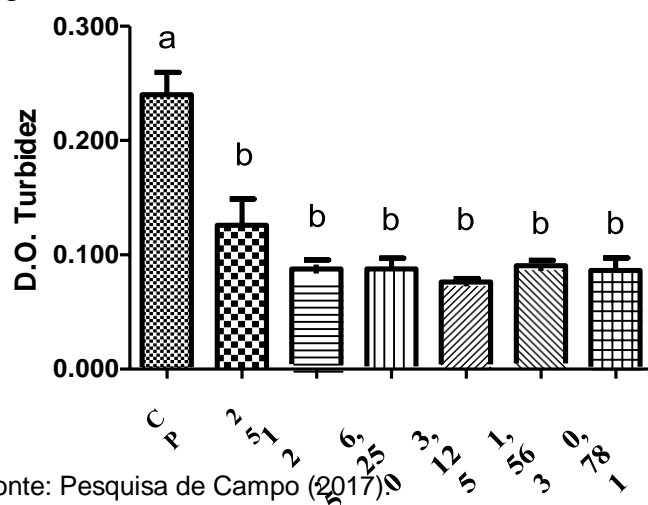
Na sequência, foi testado o óleo de citronela puro, nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, na bactéria *E. coli*. O teste de *Dunnnett* realizado (Quadro 6) indicou que existem diferenças significativas entre as concentrações testadas e o CP, o que significa que com o óleo de citronela puro foi possível obter crescimento diferente da bactéria *E. coli* do que no controle positivo, em todas as concentrações testadas.

Quadro 6 – Teste de *Dunnnett* para *E. coli* em Citronela ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1127	Sim
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1553	Sim
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1530	Sim
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1663	Sim
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1530	Sim
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1540	Sim

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Em todas as concentrações do óleo de citronela testadas, a bactéria *E. coli* apresentou comportamento diferente ao controle positivo, visto que apresentam a letra “b”, ao contrário do controle positivo que apresenta a letra “a”, conforme a Figura 10.

Figura 10 – *E. Coli* em Óleo de Citronela Puro

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Visto que com o óleo de citronela puro, em todas as concentrações testadas foi possível obter um crescimento da bactéria *E. coli* menor que no controle positivo, realizou-se o teste de *Tukey*, para comparar as médias das concentrações umas com as outras. Como pode-se ver no Quadro 7, as comparações entre as concentrações de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e as demais apresentaram diferença significativa, enquanto as demais comparações entre as concentrações umas com as outras não apresentaram diferença significativa.

Quadro 7 – Teste de *Tukey* para *E. coli* em Citronela ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
25 X $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,04267	Sim
25 X $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,04033	Sim
25 X $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,05367	Sim
25 X $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,04033	Sim
25 X $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,04133	Sim
12,5 X $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,002333	Não
12,5 X $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,0110	Não
12,5 X $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,002333	Não
12,5 X $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,001333	Não
6,250 X $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,01333	Não
6,250 X $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,0000	Não
6,250 X $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,001000	Não
3,125 X $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,01333	Não
3,125 X $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,01233	Não
1,563 X $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,001000	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Entretanto, apesar de o óleo de citronela ter conseguido um crescimento menor da bactéria *E. coli* do que no controle positivo nas concentrações testadas, quando se

utilizou uma concentração menor do óleo ($0,391 \mu\text{L.mL}^{-1}$), observou-se que a bactéria voltou a crescer. Conforme teste de *Dunnnett* houve diferença significativa entre as comparações das médias das concentrações testadas e o controle positivo, indicando que o comportamento da bactéria *E. coli* nas concentrações testadas do óleo de citronela puro foi estatisticamente diferente do comportamento da mesma no controle positivo, como pode-se ver no Quadro 8.

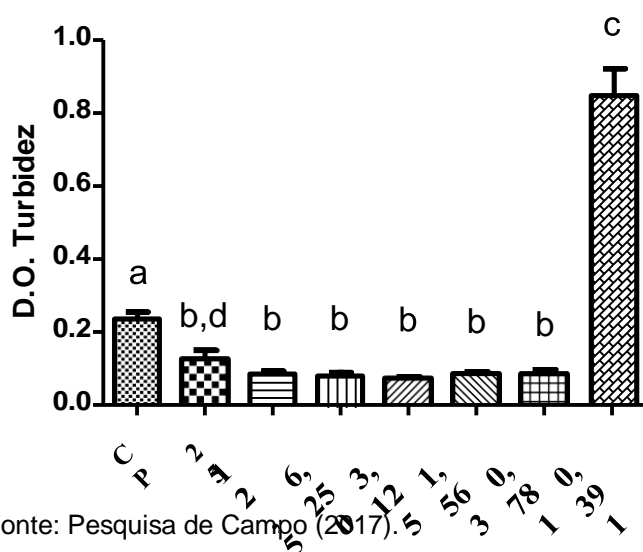
Quadro 8 – Teste de *Dunnnett* para *E. coli* em Citronela ampliado ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1127	Sim
CP X $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1553	Sim
CP X $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1530	Sim
CP X $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1663	Sim
CP X $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1530	Sim
CP X $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1540	Sim
CP X $0,391 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,6090	Sim

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Na Figura 11, a última coluna, que apresenta a letra “c”, indica que na concentração de $0,391 \mu\text{L.mL}^{-1}$, a bactéria *E. coli* teve comportamento diferente ao do controle positivo, representado pela letra “a”. Pode-se concluir então, que utilizando uma concentração menor do óleo de citronela, a bactéria voltou a crescer.

Figura 11 – *E. Coli* em Óleo de Citronela Puro (ampliado)



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Na coluna que representa a concentração de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ tem-se as letras “b” e “d”, que significam que nessa concentração do óleo, embora a atividade da bactéria

tenha sido menor que no controle positivo, ela se comporta de maneira diferente do controle positivo, conforme apresenta a Figura 11.

Depois de realizados os testes com os óleos de andiroba e citronela puro, foram testadas misturas dos óleos em diferentes proporções: 1:1 (uma medida de citronela e uma medida de andiroba), 1:2 (uma medida de citronela e duas de andiroba), e 2:1 (duas medidas de citronela e uma de andiroba). A seguir, apresentam-se os resultados dos testes realizados com as misturas dos óleos nas bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

5.2 Testes das Misturas de Óleos Essenciais

Visto que a citronela apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. coli*, realizou-se o teste com misturas dos óleos de citronela e andiroba, em diferentes proporções (1:1, 1:2 e 2:1) para verificar se a mistura melhora ou não o efeito antimicrobiano através do sinergismo.

Inicialmente, utilizou-se uma mistura entre uma medida do óleo de citronela e uma medida do óleo de andiroba na bactéria *S. aureus* nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Para comparação entre as médias das concentrações e a média do controle positivo foi realizado o teste de *Dunnett*, que indicou que houve diferença significativa nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, enquanto nas concentrações de 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ não houve diferença significativa.

Quadro 9 – Teste de *Dunnett* para *S. aureus* em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$)

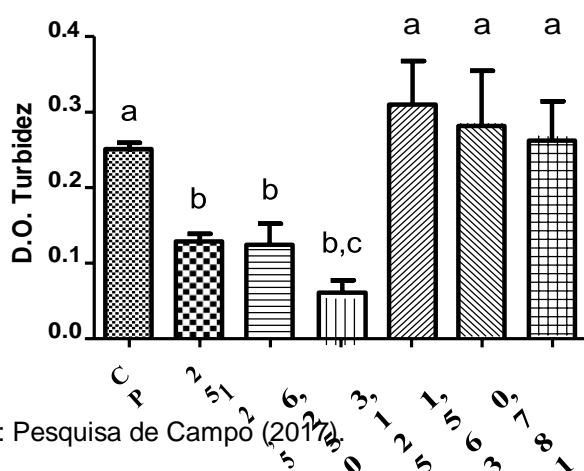
Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1213	Sim
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1260	Sim
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1880	Sim
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,06100	Não
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,03133	Não
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,01300	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Conforme apresenta a Figura 12, com a mistura dos óleos na proporção 1:1, foi possível obter um crescimento menor que no controle positivo nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, visto que as respectivas colunas apresentam a letra “b”, “b” e “b,c”, indicando que o comportamento da bactéria *S.*

aureus nessas concentrações foi estatisticamente diferente do comportamento da mesma no controle positivo. No entanto, nas concentrações de $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $1,583 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$, cujas colunas estão representadas pela letra “a”, o comportamento da bactéria *S. aureus* foi estatisticamente semelhante ao comportamento dela no controle positivo. Na concentração de $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$ o comportamento foi diferente das demais, visto que a respectiva coluna apresenta as letras “b,c”.

Figura 12 – *S. Aureus* em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:1



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

A partir desse resultado, realizou-se o teste de *Tukey* para comparar as médias das concentrações que apresentaram diferença significativa. O teste de *Tukey* indicou que houve diferenças significativas nas comparações entre as médias das concentrações de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e de $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$, como mostra o Quadro 10, a seguir.

Quadro 10 – Teste de *Tukey* para *S. aureus* em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
25 X $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,004667	Não
25 X $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,06667	Sim
12,5 X $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,0620	Sim

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

No teste realizado com a bactéria *E. coli* na mistura dos óleos de citronela e andiroba, com uma medida de cada, nas concentrações de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$. O teste de *Dunnnett*

indicou que houve diferenças significativas em todas as concentrações testadas, conforme demonstra o Quadro 11.

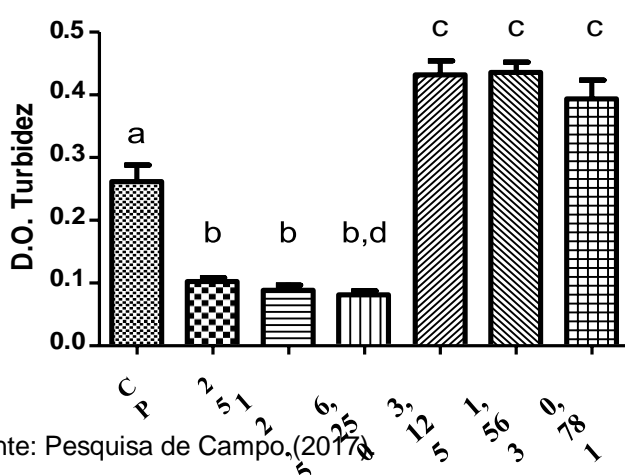
Quadro 11 – Teste de *Dunnett* para *E. coli* em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1597	Sim
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1700	Sim
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1813	Sim
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1690	Sim
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1740	Sim
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1320	Sim

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Assim, como pode-se ver na Figura 13, o comportamento da bactéria *E. coli* em todas as concentrações da mistura testada foi estatisticamente diferente do comportamento da bactéria no controle positivo. Contudo, apenas nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, cujas colunas estão representadas pelas letras “b”, “b” e “b,d”, a bactéria cresceu menos que no controle positivo, enquanto nas concentrações de 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, com colunas representadas pela letra “c” a bactéria cresceu mais do que no controle positivo. Na concentração de 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ a bactéria apresentou comportamento diferente das demais concentrações visto que sua coluna está representada pelas letras “b,d”.

Figura 13 – *E. Coli* em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:1



Fonte: Pesquisa de Campo, (2017).

Realizou-se então, o teste de *Tukey* com as concentrações em que a bactéria apresentou crescimento menor que o controle positivo. Como mostra o Quadro 12, apenas houve diferença significativa na comparação entre as concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$.

Quadro 12 – Teste de *Tukey* para *E. coli* em Mistura CIT-AND 1:1 ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
25 X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,01033	Não
25 X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,02167	Sim
12,5 X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,01133	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

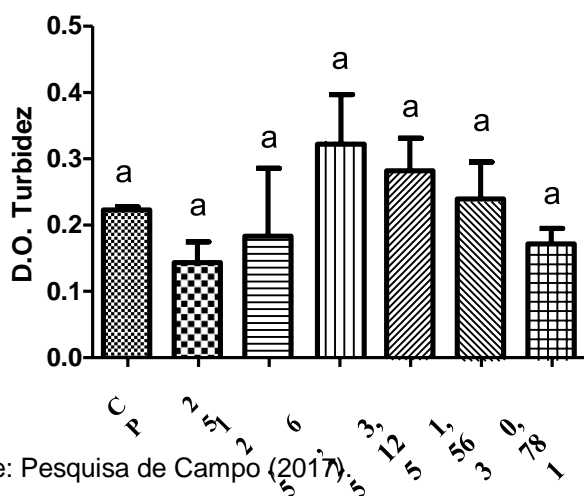
Foi feito também um teste com a bactéria *S. aureus* em uma mistura entre uma medida do óleo de citronela e uma medida do óleo de andiroba nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. O teste de *Dunnett* indicou que não houve nenhuma diferença significativa nas concentrações testadas, como demonstra o Quadro 13.

Quadro 13 – Teste de *Dunnett* para *S. aureus* em Mistura CIT-AND 1:2 ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,07733	Não
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,04200	Não
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,09967	Não
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,05833	Não
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,01700	Não
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,05033	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

A Figura 14 mostra que o comportamento da bactéria *S. aureus* frente a mistura de óleos essenciais na proporção 1:2 foi estatisticamente semelhante ao comportamento da bactéria no controle positivo, ou seja, essa mistura não conseguiu diminuir o crescimento da bactéria em todas as concentrações testadas. Todas as colunas que representam as concentrações da mistura testada apresentam a letra “a”, bem como o controle positivo, como é possível observar na Figura 14, a seguir.

Figura 14 – *S. Aureus* em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:2

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

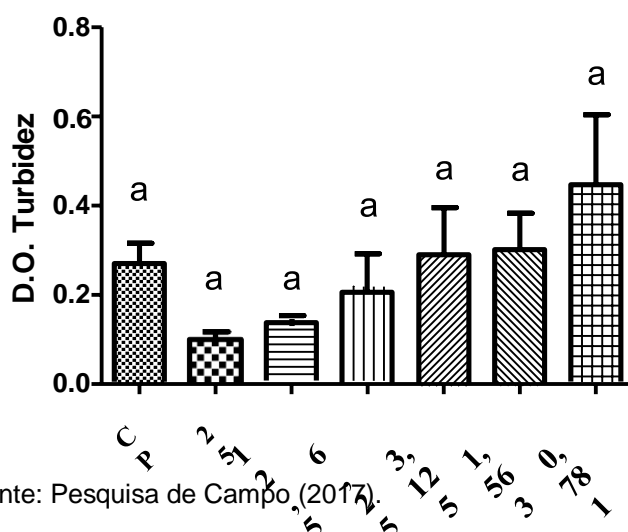
Testou-se também a mistura de uma medida de citronela e duas de andiroba, nas concentrações de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$ na bactéria *E. coli*. O teste de *Dunnnett* demonstrou que também não houve diferenças significativas nas concentrações testadas, conforme apresenta o Quadro 14.

Quadro 14 – Teste de *Dunnnett* para *E. coli* em Mistura CIT-AND 1:2 ($p < 0,05$)

Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1667	Não
CP X $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1353	Não
CP X $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$	0,05633	Não
CP X $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,02467	Não
CP X $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,0370	Não
CP X $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1763	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

A bactéria *E. coli* frente a mistura dos óleos de citronela e andiroba na proporção de 1:2, em todas as concentrações testadas, comportou-se de maneira estatisticamente semelhante a bactéria no controle positivo. Como pode-se observar na Figura 15, a bactéria teve um crescimento, visto que todas as colunas estão representadas pela letra “a”, igualmente ao controle positivo.

Figura 15 – *E. Coli* em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 1:2

Fonte: Pesquisa de Campo, (2017).

É importante destacar que, diante de uma maior quantidade do óleo de andiroba, as duas bactérias apresentaram comportamento semelhante ao controle positivo, o que pode ter acontecido devido ao fato de o óleo de andiroba ter inibido o efeito do óleo de citronela, visto que este quando testado puro na bactéria *E. coli* conseguiu diminuir o seu crescimento.

Outra mistura entre os óleos essenciais foi testada, agora com duas medidas do óleo de citronela e uma do óleo de andiroba na bactéria *S. aureus*, nas concentrações de de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Conforme o teste de *Dunnnett* apresentado no Quadro 15, apenas a concentração de 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ apresentou diferença significativa.

Quadro 15 – Teste de *Dunnnett* para *S. aureus* em Mistura CIT-AND 2:1 ($p < 0,05$)

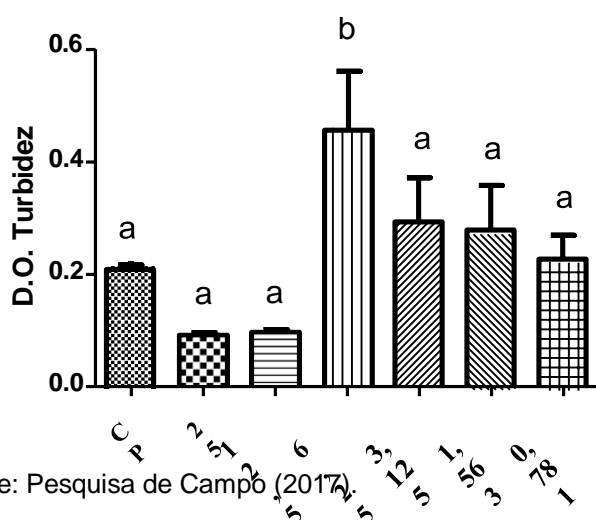
Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1227	Não
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1190	Não
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,2433	Sim
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,07983	Não
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,06200	Não
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,0130	Não

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Na Figura 16, tem-se que a concentração de 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ apresentou crescimento diferente das demais, sendo representada pela letra “b”. No entanto, pode-se observar que esta coluna apresenta crescimento maior que o controle positivo. Este resultado pode ser explicado por uma contaminação na placa onde

realizou-se o teste. As outras concentrações testadas apresentaram comportamento estatisticamente semelhante ao controle positivo, onde a bactéria apresentou crescimento. Como o objetivo desse estudo é a diminuição do crescimento, esse resultado foi desconsiderado e não foi necessário realizar o teste de *Tukey*.

Figura 16 – *S. Aureus* em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 2:1



Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

Por último, foi realizado o teste da bactéria *E. coli* na mistura de duas medidas de óleo de citronela e uma medida de óleo de andiroba, nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. O teste de *Dunnnett* indicou que as concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle positivo, como pode-se observar no Quadro 16.

Quadro 16 – Teste de *Dunnnett* para *E. coli* em Mistura CIT-AND 2:1 ($p < 0,05$)

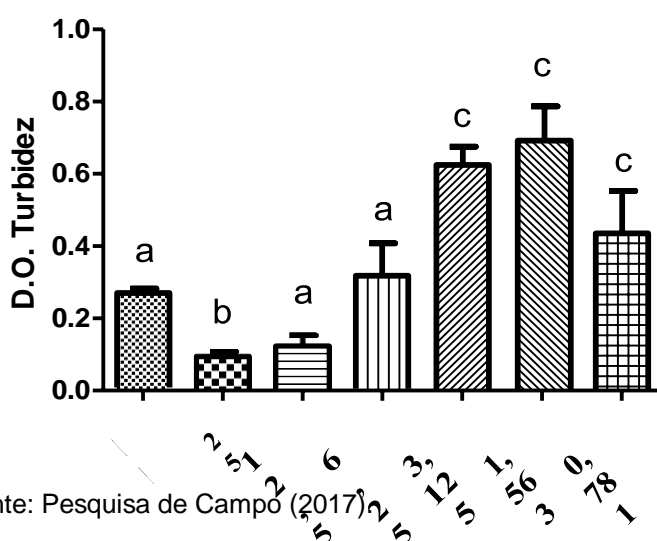
Comparações	Resultado	Diferença Significativa
CP X 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1707	Sim
CP X 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	0,1403	Não
CP X 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,05150	Não
CP X 3,125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,3623	Sim
CP X 1,563 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,4320	Sim
CP X 0,781 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	-0,1757	Sim

Fonte: Pesquisa de Campo (2017).

No entanto, apenas na concentração de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ a bactéria *E. coli* apresentou crescimento menor do que no controle positivo, representado pela letra “b”, que indica comportamento diferente do controle positivo. Nas concentrações de 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ a bactéria apresentou comportamento semelhante ao

controle positivo representados pela letra “a”, enquanto as concentrações de $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$ o comportamento foi diferente do controle positivo, representados pela letra “c”. Contudo, o único resultado que interessa a esse trabalho é o encontrado na concentração de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, onde se obteve um crescimento menor da bactéria do que no controle positivo. Deste modo, não foi necessário realizar o teste de Tukey, visto que não há outra concentração para ser comparada. A Figura 17 apresenta o comportamento da bactéria *E. coli* na mistura de óleos essenciais na proporção 2:1.

Figura 17 – *E. Coli* em Mistura de Óleos Essenciais CIT-AND 2:1



Fonte: Pesquisa de Campo (2017)

Diante de tais resultados, pode-se constatar que: o óleo de citronela puro obteve melhores resultados com relação à diminuição do crescimento da bactéria *E. coli*, nas concentrações de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $3,125 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $1,563 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $0,781 \mu\text{L.mL}^{-1}$; a mistura dos óleos de citronela e andiroba na proporção 1:1 obteve melhores resultados na diminuição do crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* nas concentrações de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $6,250 \mu\text{L.mL}^{-1}$; e a mistura dos óleos de citronela e andiroba na proporção de 2:1 obteve melhores resultados na diminuição do crescimento da bactéria *E. coli* na concentração de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$.

No estudo realizado por Machado, Pereira e Seixas (2016) o óleo de andiroba não apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Salmonella entérica*. Segundo os autores, vários fatores podem ter contribuído para esses resultados, como a extração inadequada do óleo, adição de

outros óleos, o mau armazenamento do óleo ou até a oxidação devido à presença de luz e exposição ao oxigênio do ambiente.

Em outro estudo, realizado por Packer e Luz (2007), o óleo de andiroba também não apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. No estudo de Gonçalves (2007) as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia spp*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Staphylococcus spp*, apresentaram resistência ao extrato hidroalcoólico de andiroba.

Rodrigues *et al.* (2016) também não encontraram atividade antimicrobiana do óleo de andiroba frente a bactéria *S. aureus*. Deste modo, pode-se concluir que uma grande diversidade de bactérias apresenta resistência ao óleo de andiroba. Todos os estudos mencionados reforçam os resultados encontrados no presente estudo, visto que o óleo de andiroba não conseguiu obter um crescimento menor do que o do controle positivo das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Com relação ao óleo de citronela, o estudo de Oliveira *et al.* (2011) encontrou-se atividade antimicrobiana do óleo de citronela frente à bactéria *Listeria monocytogenes*. No estudo de Silveira *et al.* (2012) o óleo essencial de citronela apresentou inibição nas seguintes bactérias: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *Y. enterocolitica* e *P. vulgaris*. As maiores zonas de inibição foram encontradas nas espécies gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *B. subtilis*), e a atividade antimicrobiana na *S. aureus* foi equivalente à da ampicilina.

O estudo realizado por Scherer *et al.* (2009) encontrou uma ação antimicrobiana de moderada a forte nas bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* e *C. perfringens*. Oussalah *et al.* (2007) realizaram estudo onde o óleo essencial de citronela apresentou inibição das bactérias *S. aureus*, *E. coli*, e *S. Typhimurium*. Bem como no presente estudo, as pesquisas citadas apresentaram resultados positivos quanto à atividade antimicrobiana do óleo de citronela, que conseguiu obter um crescimento da bactéria *E. coli* menor que no controle positivo. Assim, estes estudos confirmam os resultados encontrados neste trabalho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela e andiroba em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Através dos experimentos realizados foi possível analisar a atividade dos óleos de citronela e andiroba e das misturas entre eles, nas diferentes proporções e concentrações testadas, no crescimento das bactérias. Pode-se observar com esses experimentos que em algumas concentrações dos óleos o crescimento da bactéria foi menor que no controle positivo, enquanto houve concentrações em que o crescimento foi semelhante ao do controle positivo, e também houve concentrações em que este crescimento foi maior que no controle positivo. Desse modo pode-se concluir que o objetivo geral do estudo foi alcançado.

Quanto ao objetivo específico “Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de andiroba em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*”, foi possível observar que o óleo de andiroba não apresentou resultados significativos quanto à diminuição do crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, que apresentaram crescimento estatisticamente semelhante ao controle positivo em todas as concentrações testadas.

Com relação ao objetivo específico “Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de citronela em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*”, foi possível verificar que o óleo de citronela em todas as concentrações testadas não apresentou resultados significativos com relação à diminuição do crescimento da bactéria *S. aureus*, visto que essa apresentou crescimento estatisticamente semelhante ao controle positivo. No entanto, o óleo de citronela apresentou resultados significativos no que diz respeito ao crescimento da bactéria *E. coli*, onde conseguiu obter um crescimento menor que no controle positivo em todas as concentrações testadas.

No que diz respeito ao objetivo específico “Avaliar os efeitos sobre a atividade antimicrobiana individual, da mistura dos óleos essenciais de citronela e andiroba nas proporções de 1:1, 1:2 e 2:1 sobre as cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*”, verificou-se que a mistura dos óleos de citronela e andiroba na proporção 1:1 obteve resultados significativos quanto à diminuição do crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* apenas nas concentrações de 25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 6,250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, onde estas cresceram menos que no controle positivo. A mistura dos óleos de citronela e andiroba na proporção 1:2 não obteve resultados significativos na

diminuição do crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* em todas as concentrações testadas, visto que cresceram de maneira estatisticamente semelhante ao controle positivo. A mistura dos óleos de citronela e andiroba na proporção de 2:1 obteve resultados significativos na diminuição do crescimento da bactéria *E. coli* apenas na concentração de $25 \mu\text{L.mL}^{-1}$, onde esta cresceu menos que no controle positivo, enquanto na bactéria *S. aureus* não foi possível diminuir o seu crescimento em todas as concentrações testadas.

Assim, pode-se concluir que, no que se refere aos testes realizados com os óleos essenciais puros, apenas o óleo de citronela em todas as concentrações testadas na bactéria *E. coli* apresentou resultado positivo para esse estudo. O óleo de andiroba não apresentou resultados positivos para nenhuma das bactérias. Contudo, o sinergismo entre o óleo de andiroba e o óleo de citronela obteve resultados positivos para esse estudo em algumas das proporções testadas. A proporção de 1:1 apresentou resultado positivo para esse estudo nas bactérias *S. aureus* e *E. coli*. E a proporção de 2:1 apresentou resultado positivo na bactéria *E. coli*. Na proporção 1:2 não foi possível obter resultado positivo, o que pode ter acontecido por conta da maior quantidade de óleo de andiroba, que pode ter inibido o efeito do óleo de citronela.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, M.; GONZÁLES, M.; ARAQUE, M.; VELAZCO, E.; KHOURI, N.; ROJAS, L.; USUBILLAGA, A.; Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. **Revista de la Facultad de Farmacia**, v.45, n 1, p 19-24, 2003.

ALVES T.M.A., SILVA A.F., BRANDÃO M., GRANDI T.S.M., SMÂNIA E.F., SMÂNIA Jr.A., ZANI C.L. **Biological screening of Brazilian medicinal plants**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95:367-373, 2000.

BAJPAI, V.K.; RAHMAN, A.; SUN C.K. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n.2, p.117-22, 2008.

BALUNAS, MJ & KINGHORN, AD. **Drug discovery from medicinal plants**. Life Sciences, v.8, n.5, p. 431-41, 2005.

BENETI, S.C., ROSSET, E., CORAZZA, M.L., FRIZZO, C.D., LUCCIO, M.D., & OLIVEIRA, J.V. **Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation**. Journal of Food Engineering, 2011.

BERTINI, L.M. et al. **Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil**. Revista Infarma, v.17, n.314, p.80-3, 2005.

BIZZO, H.R.; REZENDE, C.M.; HOVELL, A.M.C. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 588-594, 2009.

BONA, T. D. M. M.; PICKLER, L.; MIGLINO, L. B.; KURITZA, L. N.; VASCONCELOS, S. P.; SANTIN, E. **Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle da *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte**. Pesquisa veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 411-418, 2012.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; DELÚ-FILHO, N.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Antiinflamatórios (aspectos químicos e farmacológicos e aplicação terapêuticas)**. 1ª ed. São Paulo: Tecmed Editora, v. 1. 480 p. 2004.

COSTA, J. G. M. *et al.* **Estudo químico- biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente as larvas do *Aedes aegypti*.** Revista Brasileira de Farmacognosia. São Paulo, v. 15, n. 4, p. 304-309, out/dez, 2005.

COWAN, M.M. **Plant products and antimicrobial agents.** Clinical Microbiology Reviews, v.12, n.4, p.564-82, 1999.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista multiciência.** Campinas, v. 2, n. 7, p.1-16, out. 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996.

GALVÃO, E. L. GALVÃO, LOPES, E. **Extração do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* J.com CO2 presurizado.** Natal [s.n.], 2014.

GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais.** Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-131, jul./dez. 2012.

GONÇALVES, V.A. **Levantamento de mercado de produtos florestais não-madeireiros.** Santarém: IBAMA- ProManejo. 65pp. 2001.

GONÇALVES, A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais.** 2007. 193 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2007.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., & BOURKE, P. **The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients.** International Journal of Food Microbiology, 124, 91-97. 2008.

HALBERSTEIN, RA. **Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns.** Annals of Epidemiology, v.15, n.9, p. 686-99, 2005.

KIZIL, S.; SOGUT, T. **Investigation of antibacterial effects off spices.** Crop Research, v. 3, n.1, p. 86-90, 2003.

LIMA, I.O. *et al.* **Atividade antifúngica e óleos essenciais sobre espécies de *Candida*.** Revista Brasileira Farmacognosia, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras- Manual de identificação e cultivos de plantas Arbóreas Nativas do Brasil,** p.240, Editora Plantarum, São Paulo, 1992.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

MACHADO, C. A.; SEIXAS, F. R. F.; PEREIRA, K. O. Ação antibacteriana em óleos essenciais. **Jornada Científica da UNESC-2016**, n. 1, 2016.

MAIA, S. R. **Uso da *Curcuma longa* L. na redução de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota**. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2003.

MELLO, Valéria de et al. **Desenvolvimento e avaliação in vitro da eficácia carrapaticida de formulações de contato à base dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus*, *Syzygium aromaticum* e *Rosmarinus officinalis***. 2014.

MENDONÇA, A.P.; FERRAZ, I.D.K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Revista Acta Amazonica**, vol. 37(3) 2007.

OLIVEIRA, M.M.M et al. **Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon***. Rev. bras. plantas med., Botucatu, v. 13, n. 1, p. 08-16, 2011.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. **Inhibitory effects of selected plant essential oil on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes***. Food Control, 2007.

PEDROSA, F. P. C. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à CPMA - Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA – UNICAMP** – Botucatu: s[n.], 2012.

PEREIRA, A. A.; **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. Universidade Federal de Lavras- UFLA, 2006.

PACKER, J.F.; LUZ, M. M. S. **Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural**, Rev. Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, Curitiba, PR, Brasil v. 17, nº 1 P. 102-107, 2007.

PERINI, S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente *Astaphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina**. Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2013.

PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Instituto de Biociência – UNESP. Botucatu, 2012.

ROCHA, S.F.R.; MING, L.C.; MARQUES, M.O.M. **Influência de Cinco Temperaturas de Secagem no Rendimento e Composição do Óleo Essencial de Citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt)**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. Botucatu, 2000.

RODRIGUES, M.A.V. , MARANGON, C.A , LEITE, P. M. F. , MARTINS, V. C. A. , NITSCHKE, M. , PLEPIS, A. M. G. **Emulsões de quitosana/gelatina com óleos de andiroba e de pracaxi: avaliação da atividade antimicrobiana sobre Staphylococcus aureus.** Universidade de São Paulo - USP, 2016.

RODRIGUES, K. L. MOREIRA, A. N. ALMEIDA, A. T. S. CHUICHETA, D. RODRIGUES, M. J. BROD, D. L. CARVALHO, J. B. ALEIXO, J. G. A. E. **Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional.** Ciência Rural, santa maria, v.34, n. 1, p. 297-299 jan/fevereiro, 2004.

SANTOS, A. L. **Comportamento do *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal fabricado com leite cru.** 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2004.

SARTO, M.P.M.; ZANUSSO JUNIOR, G. **Atividade microbiana de óleos essenciais.** Revista Uningá, Vol.20,n.1,pp.98-102, Out – Dez, 2014.

SCHERER, R. et al . **Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa.** Rev. bras. plantas med., Botucatu , v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas.** Instituto de Biociência – UNESP. Botucatu, 2010.

SILVEIRA S.M.; CUNHA Jr. A, SCHEUERMANN G.N.; SECCHI F.L.; VERRUCK S.; KROHN M, et al. **Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda).** Rev Inst Adolfo Lutz. São Paulo, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 5ª edição. Porto Alegre, RS: Editora UFSC, 2004.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. **Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents.** Curr Opin Biotech. 23:1-6, 2011.

TAWATSIN A.; RATTEN S.D.; SCOTT R.R., et al. **Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors.** J Vector Ecol, 2001.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos.** Porto Alegre: Sulina, 2011.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 8a. ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. (Ed). **Microbiologia.** 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

TRANCOSO, M. D. **Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no Cotidiano.** Revista PráxisCBNB - Colégio Brigadeiro Newton Braga, Rio de Janeiro, n.9, Junho de 2013.